ChinaXiv合作期刊

chinaXiv:201904.00094v1

6-羟基烟酸 3-单加氧酶（NicC）催化反应机理研究*

王菲　胡春辉　于浩**

(青岛农业大学 生命科学学院 山东省应用真菌重点实验室 青岛 266109)

摘　要：恶臭假单胞菌（*Pseudomonas putida*）KT2440 中的 6-羟基烟酸（6HNA）3-单加氧酶（NicC）是烟酸代谢过程中的关键酶。NicC 通过在吡啶环上加羟基对吡啶环进行了活化，从而使得吡啶环可在双加氧酶催化下开环最终被完全降解。本研究通过去除 NicC 的 N 端稀有密码子增加了 NicC 的表达量，进一步利用 Ni-Sepharose 重力柱对 NicC 进行了纯化。通过实验发现，NicC 的最适反应温度为 30℃-40℃，最适反应 pH 为 8.0。Cd^{2+} 离子对于 NicC 的酶活有明显的抑制作用。当 NADH 的浓度为 0.25 mM 的时候，底物 6HNA 所对应的 NicC 的最大酶活为 14.1 U/mg，K_m 值为 51.8 μM；当 6HNA 的浓度为 0.25 mM 的时候，底物 NADH 所对应的 NicC 的最大酶活为 10.79 U/mg，K_m 值为 15.0 μM。通过 HPLC 和 LC-MS 分析表明，NicC 可以在 NADH 和氧气的参与下催化 6HNA 转化生成 2,5-二羟基吡啶（2,5-DHP）和甲酸，另外可以将对羟基苯甲酸转化生成对苯二酚。同位素标记实验表明产物 2,5-DHP 中的氧原子来源于参与反应的氧气。该研究为研究吡啶类化合物微生物代谢提供了理论基础。

关键词：6-羟基烟酸 3-羟化酶；酶学性质；催化机理；同位素标记

Catalytic Mechanism of 6-Hydroxynicotinic Acid 3-Monooxygenase (NicC)*

WANG Fei　HU Chun-Hui　YU Hao**

(Shandong Provincial Key Laboratory of Applied Mycology, College of Life Science, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China)

Abstract: 6-Hydroxynicotinic acid (6HNA) 3-monooxygenase (NicC) is the key enzyme for nicotinic degradation in *Pseudomonas putida* KT2440. NicC can catalyze the hydroxylation of pyridine ring to promote the ring cleavage reaction of pyridine ring. The expression level of NicC was enhanced by replace the rare codon in the *N*-terminal of NicC, and then the His-tagged NicC was purified to homogeneity. The optimal temperature reaction range of NicC is from 30℃ to 40℃, and the optimal reaction pH is 8.0. The Cd^{2+} ion could significantly inhibit the activity of NicC. The apparent K_m and V_{max} values of the purified NicC for 6HNA were 51.8 μM and 14.1

*该项目受到了国家自然基金青年项目(31600086)、山东省自然基金青年基金(No. ZR2016CQ06)、青岛农业大学人才科研启动基金(No. 6631115052)的资助

**通讯作者，Tel：86-532-88030292；电子信箱：yuhaosunshine@163.com

U/mg, respectively, and those for NADH were 15.0 μM and 10.79 U/mg, respectively. According to the HPLC and LC-MS analysis, NicC could catalyzes 6HNA to form 2,5-DHP and formic acid, and it could also transform 4-hydroxybenzoic acid to form hydroquinone. Isotope labeling experiments proved that the oxygen atom incorporated into 2,5-DHP is from dioxygen. The study will provide useful information for the microbial degradation of pyridinic compounds.

Key words: 6-hydroxynicotinic acid 3-monooxygenase; enzymatic properties; catalytic mechanism; isotope labeling experiments

chinaXiv:201904.00094v1

吡啶及其衍生物是一类重要的*N*-杂环污染物，除了吡啶、烟酸、尼古丁等少数吡啶类化合物之外，大部分吡啶类污染物，都是有通过机化学合成的，主要来自于石油化工、印染、农药生产、制药等行业[1-4]。该类化合物会通过生产污水、农业生产、生活污水等途径进入自然环境中。吡啶化合物水溶性较好，易通过水体在环境中进行扩散。吡啶类污染物生物毒性高，具有致癌、致畸、致突变的作用，对人类和其他生物造成了严重危害，因此消除环境中的吡啶类污染物十分必要，微生物是去除环境中的吡啶化合物的最有效手段，得到了广泛的关注[5-9]。吡啶类污染物的生物好氧降解最重要的步骤就是吡啶环的开环反应，与芳香环一样，吡啶环的开环需要在吡啶环上加羟基对其进行活化，随后再通过双加氧反应进行吡啶环的开环[10, 11]。目前已经报道的吡啶羟化酶主要有两类，一类是吡啶α-羟化酶，该类酶多为多亚基的钼结合羟化酶，例如烟酸羟化酶、尼古丁羟化酶。另一类是吡啶β-羟化酶，该类酶多为黄素依赖的单加氧酶，例如6-羟基烟酸3-单加氧酶、6-羟基-3-琥珀酰吡啶羟化酶[4,5,8]。研究吡啶环羟化酶是研究吡啶类污染物微生物降解的核心问题之一。

当一个新的化合物进入自然环境中，通常需要20-30年才能出现能够降解这种化合物的微生物。通过研究模式化合物可以有助于我们更好的研究该类化合物的微生物降解过程，甚至改造出新型的降解酶。烟酸，又称为维生素B3，是最常见的吡啶化合物，在生物体中广泛参与了NAD^+、$NADP^+$等辅酶的生物合成[10]。烟酸可以作为底物供给微生物生长，是研究吡啶类化合物微生物降解的模式化合物。目前在多个菌株中报道了烟酸代谢过程，包括假单胞菌、产碱杆菌、芽孢杆菌等[10, 12, 13]，并揭示了多条烟酸降解途径。根据已报到文献和生物信息学分析表明，微生物主要通过2,5-二羟基吡啶（2,5-DHP）途径对烟酸进行降解。该途径中，烟酸首先由烟酸羟化酶（吡啶α羟化酶）催化生成6-羟基烟酸（6HNA），随后6-羟基烟酸在6-羟基烟酸3-单加氧酶（吡啶β羟化酶）的催化下生成2,5-DHP，随后2,5-DHP在双加氧酶的作用下开环，形成脂肪族化合物。6-羟基烟酸3-单加氧酶在烟酸代谢中起到了关键性的作用，是最早报道的吡啶β羟化酶，也是目前研究最深入的吡啶β羟化酶[10]。恶臭假单胞菌KT2440中的6-羟基烟酸3-单加氧酶（*nicC*）基因和荧光假单胞菌TN5中的6-羟基烟酸3-单加氧酶基因均进行了体外克隆表达和功能验证[10, 14, 15]。虽然有文献已经报道了6-羟基烟酸3-单加氧酶的催化过程，但是其催化反应报道并不完全，对于该反应的产物并没有进行实

chinaXiv:201904.00094v1

验验证，而产物类型进一步会影响对于催化机理的判断[16]。因此揭示 6-羟基烟酸 3-单加氧酶的催化反应过程对于研究吡啶β羟化酶具有重要意义。

本研究中，我们对 NicC 进行改造增加了其表达量，并在大肠杆菌中对 NicC 进行了异源纯化。利用纯酶对 NicC 的催化性质和催化反应动力学进行了研究，进一步通过同位素标记实验对 NicC 的催化机理进行了推测。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒及培养条件

6-羟基烟酸、FAD、NADH、NADPH、LB 肉汤培养基、Ni-NTA 亲和层析填料购买自生工生物工程（上海）股份有限公司。$^{18}O_2$ 同位素标记气体购买自上海化工研究院。本研究使用的全部有机溶剂均为高效液相色谱（HPLC）等级。本研究中使用的所有其他化学品均为分析纯等级。pET28a 用于载体构建，大肠杆菌（*Escherichia coli*）BL21(DE3)用于蛋白表达，恶臭假单胞菌 KT2440 用于基因组提取。

E. coli 细胞在 LB 肉汤培养基中培养，培养条件为 37℃，200 r/min (rpm)。固体培养基需要在 LB 液体培养基中加入 2 % (w/v)的琼脂粉。

1.2 *nicC* 基因的克隆与 NicC 蛋白的诱导表达、纯化

以菌株 *Pseudomonas putida* KT2440 的基因组作为模板，利用 PCR 的方法扩增出 *nicC* 基因条带并进行回收，引物为 28a-*nicC*-F（5'-ATA**CCATGG**GGGGT**CGC**CAGAAAATCGCAATCG-3'）、28a-*nicC*-R（5'-GTG**CTCGAG**TGCCGCCTCCCCGCTTTCAAG-3'）（限制性内切酶位点、更换的密码子位点已经用下划线标记出）。利用限制性内切酶 *Nco*I 和 *Xho*I 对 *nicC* 基因片段和 pET28a 载体进行酶切，将酶切后的片段利用 T4 DNA 连接酶进行连接，并将连接产物直接转化到 *E. coli* BL21(DE3)中，并涂布到含有卡那霉素的 LB 固体平板上进行筛选。挑取平板上长出的转化子，利用 T7 和 T7 ter 引物进行 PCR 验证，将条带大小正确的重组质粒送到公司进行测序，最终获得 pET28a-*nicC* 重组质粒。

将重组菌株 *E. coli* BL21 (pET28a-*nicC*)接种到 1 L LB 液体培养基中并加入相应的抗生素，在 37℃，200 rpm 条件下培养。实时监测菌株生长状态，待 OD_{600nm} 到达 0.6~0.8 时，加入终浓度为 1 mM 的 IPTG，在 16℃培养过夜，进行蛋白诱导表达。将过夜诱导的培养物进行离心，8,000 rpm 离心 5 min。离心后丢弃上清，用 20 mL 的缓冲液（25 mM Tris-HCl, pH 8.0）重悬沉淀后的细胞，利用 20 mL 25 mM Tris-HCl (pH 8.0)缓冲液重悬后利用超声波破碎仪进行细胞破碎，将破碎后的菌液经 10,000 rpm 离心 2 min，将上清液转移至新的离心管中，经 Ni-NTA 亲和层析重力柱（柱体积 1 mL）进行蛋白纯化。首先利用 10 mL 25 mM Tris-HCl (pH 8.0)缓冲液平衡 Ni-NTA 亲和层析柱，平衡后开始上样，上样后用 25 mM Tris-HCl (pH 8.0)缓冲液冲洗层析柱。用 3 mL 含有 40 mM 咪唑的缓冲液进行蛋白洗脱并收集。利用超滤管对收集到的洗脱流出液进行蛋白超滤，以去除高浓度的咪唑。将收集后的蛋白放到-20℃冰箱中保存。

1.3 NicC 的酶活测定

NicC 的酶活使用分光光度计通过测定 340 nm 波长下 NADH 的消耗来进行测定。酶催化反应体系为 800 μL，缓冲液为 50 mM Tris-HCl（pH 8.0），反应温度为 25℃。反应时依次加入 NicC 和底物 6HNA，最后加入 NADH 开始反应。由于产物 2,5-DHP 在 340 nm 处也有吸光值，因此实验过程中分别测定了 NADH 和 2,5-DHP 在 340 nm 处的摩尔吸光系数，最终得到了反应的表观摩尔吸光系数为 2,063 M^{-1} cm^{-1}，并以此为标准测定 NicC 的酶活。

1.4 NicC 的酶学性质研究

酶促反应最适温度测定：在 0-60℃每隔 5℃设置一个实验组，将缓冲液和底物分别在设定的温度条件下恒温水浴 5 min 后，加入 NicC，在 340 nm 波长下检测酶促反应吸光值变化。

温度稳定性测定：将 NicC 蛋白分别在 0℃、30℃、35℃、40℃、45℃温度条件下保温，各温度处理组分别在 0 h、0.5 h、1 h、1.5 h、2 h 时取出部分酶测定各温度下的纯酶活力。

酶促反应最适 pH 测定：分别在不同 pH 的缓冲液（pH 4.0 ~ pH 6.0：50 mM 柠檬酸/柠檬酸三钠；pH 6.0 ~ pH 9.0：50 mM 磷酸盐缓冲液；pH 9.0 ~ pH 11.0：50 mM 碳酸钠/碳酸氢钠）中测定 NicC 的酶活。

金属离子对 NicC 酶活性的影响：

在 NicC 酶促反应体系中加入终浓度为 2 mM 的金属离子：Ca^{2+}、Co^{2+}、K^{+}、Mg^{2+}、Cd^{2+}、Mo^{6+}、Mn^{2+}、Ba^{2+}、Cu^{2+}、Na^{+}、Zn^{2+}。以不加金属离子的 NicC 反应体系为对照，测定 340 nm 下的吸光值变化，比较金属离子对 NicC 酶活性的影响。

底物特异性分析：分别以对氨基苯甲酸（PAB）、对羟基苯甲酸（PHB）和对硝基苯甲酸作为底物，测定 NicC 酶促反应的酶活。以对氨基苯甲酸和对羟基苯甲酸作为底物的时候也在 340 nm 处测定酶活，以对硝基苯甲酸（PNP）作为底物的时候同时检测 340 nm 和 400 nm 处的吸光值变化。以相同浓度的 6-羟基烟酸作为底物的反应体系作为阳性对照。

NicC 的催化反应动力学分析：在 0.25 mM NADH 下测定不同浓度的 6HNA 下 NicC 酶促反应的酶活；在 0.25 mM 6HNA 存在下测定不同浓度 NADH 的 NicC 酶促反应酶活。反应在 25℃，50 mM 的 Tris-HCl（pH 8.0）中进行。将所得的数据，利用 Origin 8.0 软件进行米氏方程的非线性拟合，最终确定两个底物的最大反应速率和 K_m 值。

1.5 NicC 的催化反应产物鉴定

将 NicC 与 1 mM 6HNA 和 2 mM NADH 混合进行反应，5 min 后，向反应体系中加入 2 倍体积甲醇终止反应。利用 HPLC 和 LC-MS 对反应产物进行检测。

重氧水同位素标记实验：将纯化出的 NicC 在冷冻真空干燥仪上进行冻干制备冻干粉，利用重氧水进行溶解。底物 6HNA 和 NADH 同样用重氧水进行溶解。将重氧水溶解后的 NicC 与底物 6HNA 和 NADH 混合，在空气中反应 10 min 之后，进行 LC-MS 检测。

氧-18 标记氧气的同位素标记实验：以 5 mL 西林瓶为反应容器，加入 2 mL

chinaXiv:201904.00094v1

终浓度为 1 mM 的 6HNA，1.5 mM 的 NADH。向该体系中以 0.1 L/min 的流速吹入氩气，连续通气 20 min 以排尽反应装置中的氧气。20 min 后，向反应系统中通入 100 mL $^{18}O_2$ 气体，并尽量混合，使 $^{18}O_2$ 气体溶解。随后加入 NicC 开始反应，20 min 后，加入 2 倍体积甲醇终止反应。进行 LC-MS 检测。

HPLC 检测条件：检测仪器为 Agilent 1100，PDA 检测器，色谱柱为 Agilent Zorbax SB-C18 (4.6 mm × 250 mm)，流动相为 20% (v/v)甲醇，80% (v/v) 1 mM 乙酸，流速为 0.5 mL/min。LC-MS 检测仪器为 Agilent 6460 QQQMS 离子源为 electrospray ionization (ESI)，色谱柱为 Zorbax SB C18 (2.1 mm × 100 mm)，流动相为 20% (v/v)甲醇，80% (v/v) ddH_2O，流速为 0.2 mL/min。

2　结果与分析

2.1　NicC 序列分析

将 NicC 的氨基酸序列与其他吡啶羟化酶以及芳香族化合物苯环羟化酶进行序列比对与进化分析。结果如图 1 所示，NicC 与水杨酸 1-羟化酶（YP_001669813）的序列相似性最高（27.7%），与另外的两个吡啶β羟化酶 2,6-二羟基吡啶 3-羟化酶（DHPH，YP 007988763，20.8%）和 6-羟基-3-琥珀酰吡啶 3-羟化酶（HspB，WP_013973865，17.3%）的序列相似性较低[17, 18]。从进化分析上面看，与 NicC 序列相似性高的蛋白所催化的底物与 6HNA 并没有太多的结构上面的相似性。这预示着 NicC 可能存在着与 HspB 不同的催化机理。

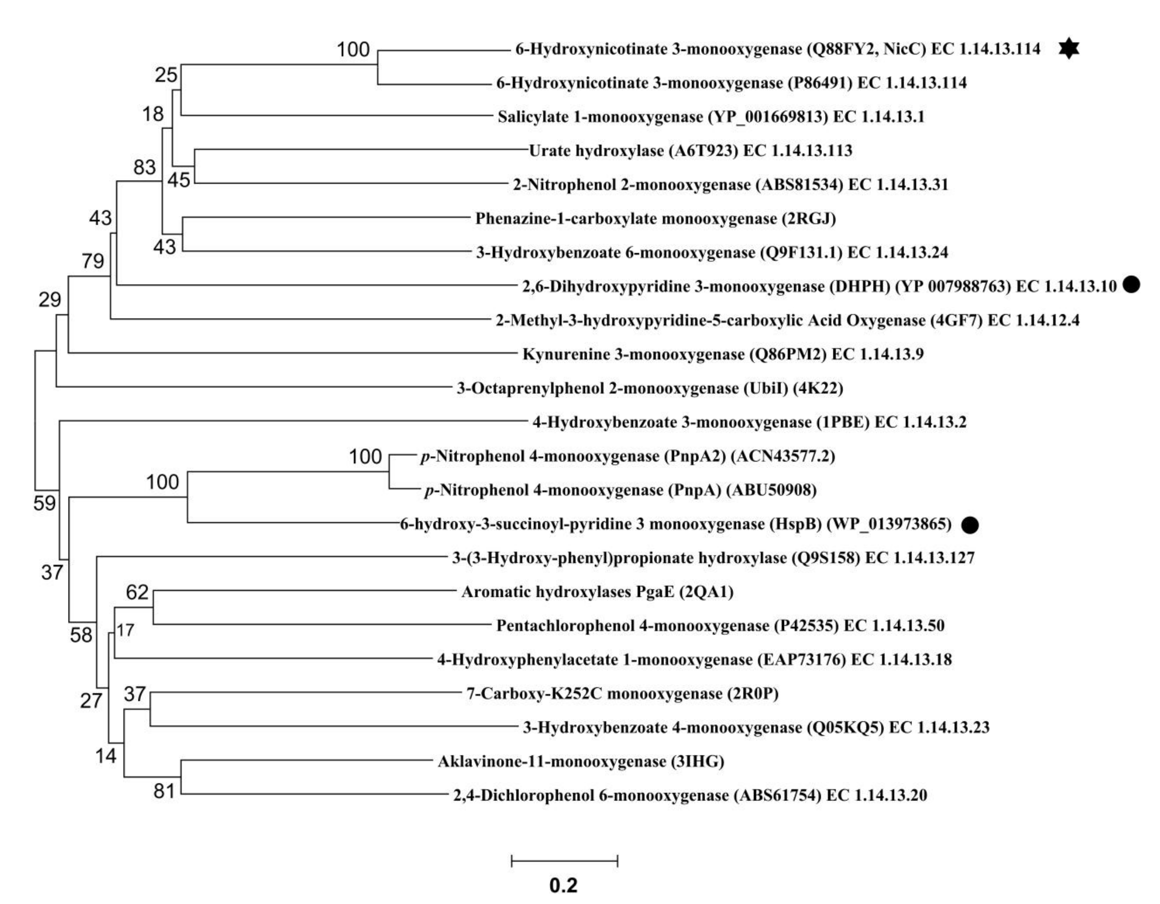


图 1　NicC 进化树分析，蛋白的序列可以通过括号中的序列号进行查询，标尺表示每个氨基酸位点出现 0.2 个替换的长度

chinaXiv:201904.00094v1

ChinaXiv合作期刊

Figure 1 Phylogenetic analysis of NicC and related hydroxylases. The accession number of each protein was indicated in parenthesis. The bar represents 0.2 amino acid substitutions per site.

2.2 NicC 蛋白纯化

将 6-羟基烟酸 3-单加氧酶(*nicC*)基因克隆到表达载体 pET28a 上，利用 IPTG 进行了诱导表达。SDS-PAGE 进行全细胞蛋白分析，没有明显蛋白表达条带。将诱导表达后的细胞破碎液上清利用 Ni-NTA Sefinose 进行亲和层析纯化，SDS-PAGE 可以检测到纯化后的 NicC 蛋白，但蛋白表达量较低。利用 Online 软件（http://people.mbi.ucla.edu/sumchan/caltor.html）对 NicC 的 *N* 端稀有密码子进行了分析，发现第四位氨基酸 Arg 为稀有密码子“AGG”（图 2A），研究表明 N 端的稀有密码子会对大肠杆菌中的蛋白表达产生明显影响[19]。为了增加 NicC 的表达量，将 NicC 的 *N* 端稀有密码子“AGG”更换成为了“CGC”。将改造后的重组质粒 pET28a-*nicC* 转化入 BL21(DE3)感受态细胞中进行诱导表达与蛋白纯化，经 SDS-PAGE 检测，NicC 分子量为~40 kDa，条带单一，*N* 端的稀有密码子去除后可以大大的提高蛋白的表达量，同样条件下蛋白表达量为未优化的~5 倍（图 2B）。经亲和层析纯化后的 NicC 蛋白呈现淡黄色。经过全波长扫描，发现 NicC 在 377 nm 和 450 nm 处有特征吸收峰（图 2C），该结果表明 NicC 蛋白为黄素蛋白。进一步通过 HPLC 检测确定，NicC 中所含有的黄素为 FAD。

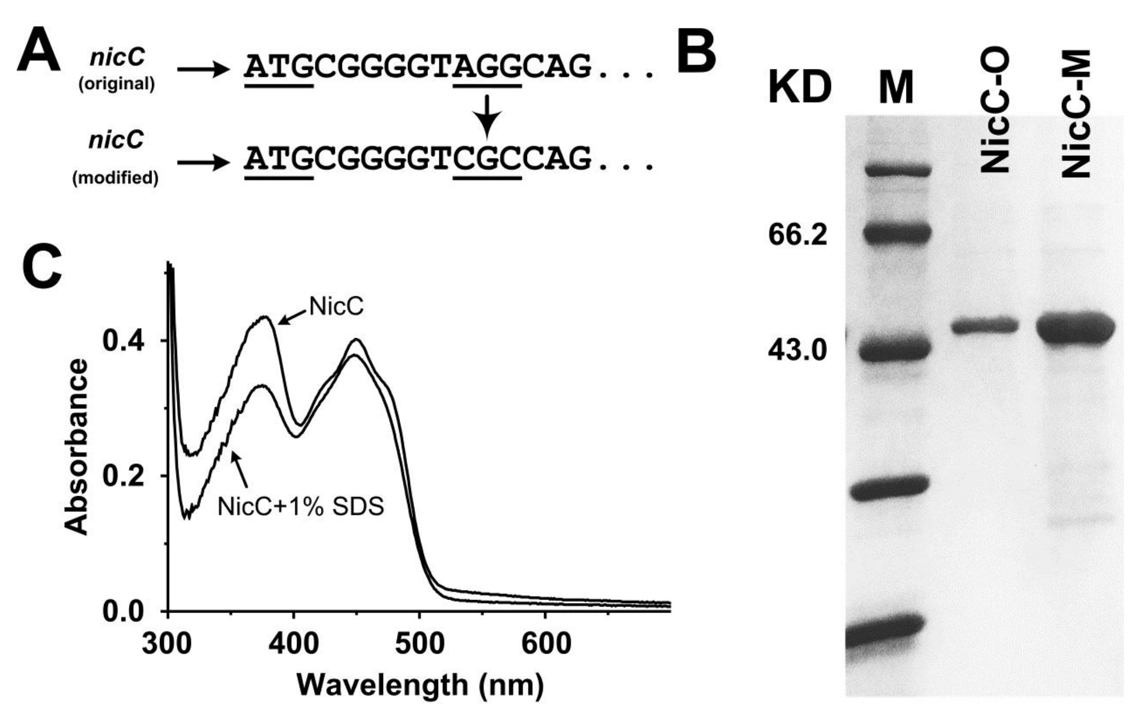


图 2 NicC 蛋白的表达纯化。（A）*nicC* 基因 N 端的稀有密码子 AGG 更换为 CGC；（B）纯化后的 NicC 蛋白，以及加入 1% (w/v) SDS 在 4℃孵育 10 min 后的 NicC 全波长扫描图谱；（C）纯化的重组 NicC 蛋白 SDS-PAGE 图谱，其中 M 为蛋白 Marker，NicC-O 为未优化的蛋白，NicC-M 为优化后的蛋白

chinaXiv:201904.00094v1

Fig. 2 Expression and purification of NicC. (A) The rare codon (AGG) in the N-terminal of *nicC* gene was changed to CGC. (B) Spectrum of NicC (black line) and NicC + 1% SDS (red line); (C) SDS-PAGE image of purified His-tagged NicC, M: protein marker, NicC-O, unmodified NicC, NicC-M, modified NicC protein.

2.3 NicC 催化反应研究

将 NicC 与 6HNA 和 NADH 混合后检测 340 nm 处吸光值，可以观察到吸光值随着时间的延长而降低。通过 HPLC 检测可以看到，在有 NADH 存在的情况下，NicC 可以将 6HNA 催化生成 2,5-二羟基吡啶（2,5-DHP），而不加入 NADH 的反应中 NicC 不能催化 6HNA 生成 2,5-DHP（图 3）。在厌氧状态下向 NicC 中加入过量的 NADH，可以发现蛋白由黄色变成无色，在 450 nm 处的特征吸收峰消失（图 4），这说明了 NADH 可以将 NicC 中的 FAD 完全还原。向还原后的 NicC 蛋白中加入 6HNA，保持厌氧状态，一段时间后终止反应，经 HPLC 检测并没有 2,5-DHP 的生成，这说明了该反应需要氧气的参与。

chinaXiv:201904.00094v1

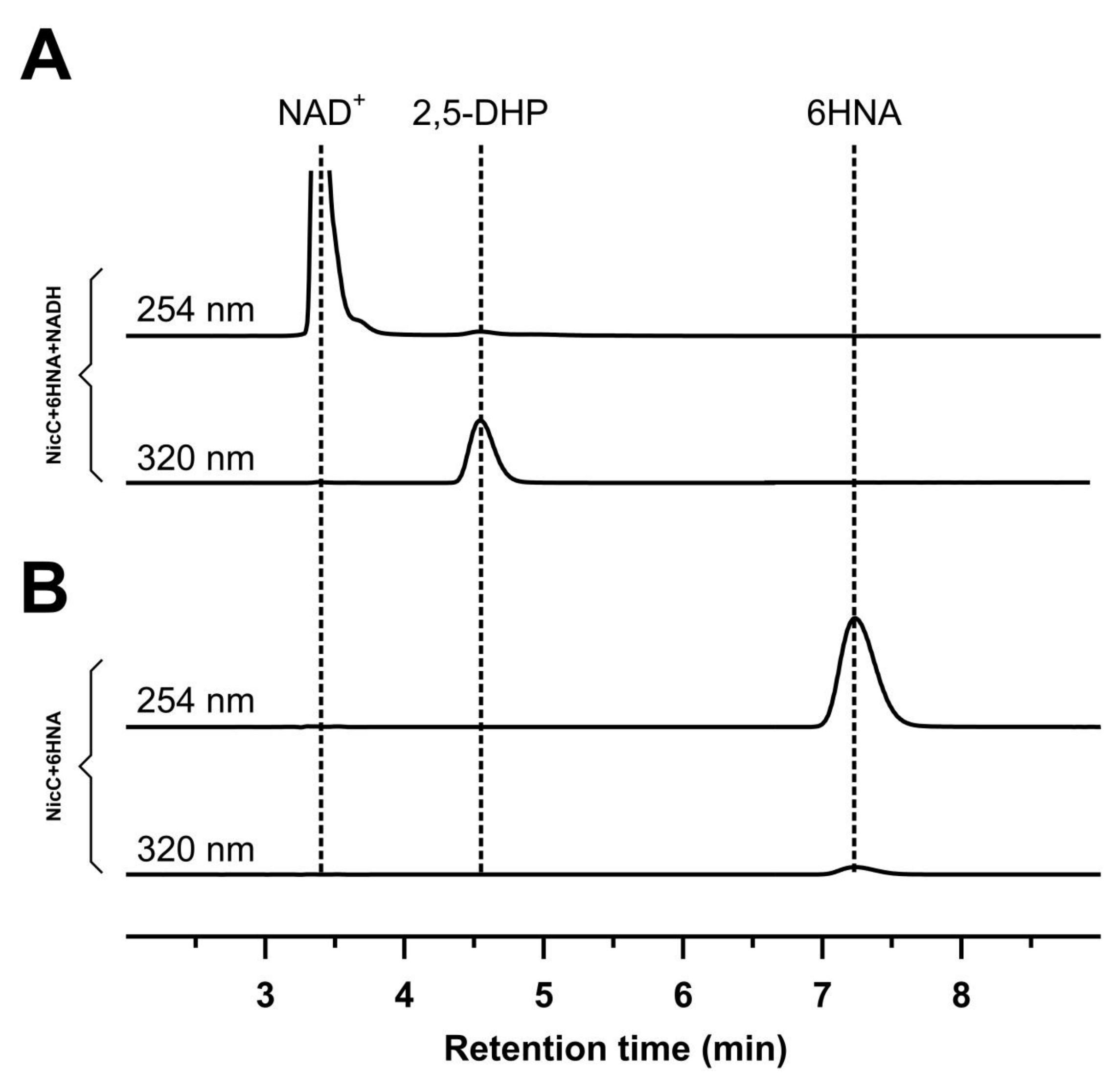


图 3 NicC 催化反应的 HPLC 分析。（A）1 mM NADH + 1 mM 6HNA + NicC 反应 5 min 后进行 HPLC 检测;（B）1 mM 6HNA + NicC 反应 5 min 后进行 HPLC

chinaXiv:201904.00094v1

检测。

Fig. 3 HPLC analysis of NicC catalyzed reaction. (A) NicC was mixed with 1 mM NADH and 1 mM 6HNA for 5 min; (B) NicC was mixed with and 1 mM 6HNA for 5 min.

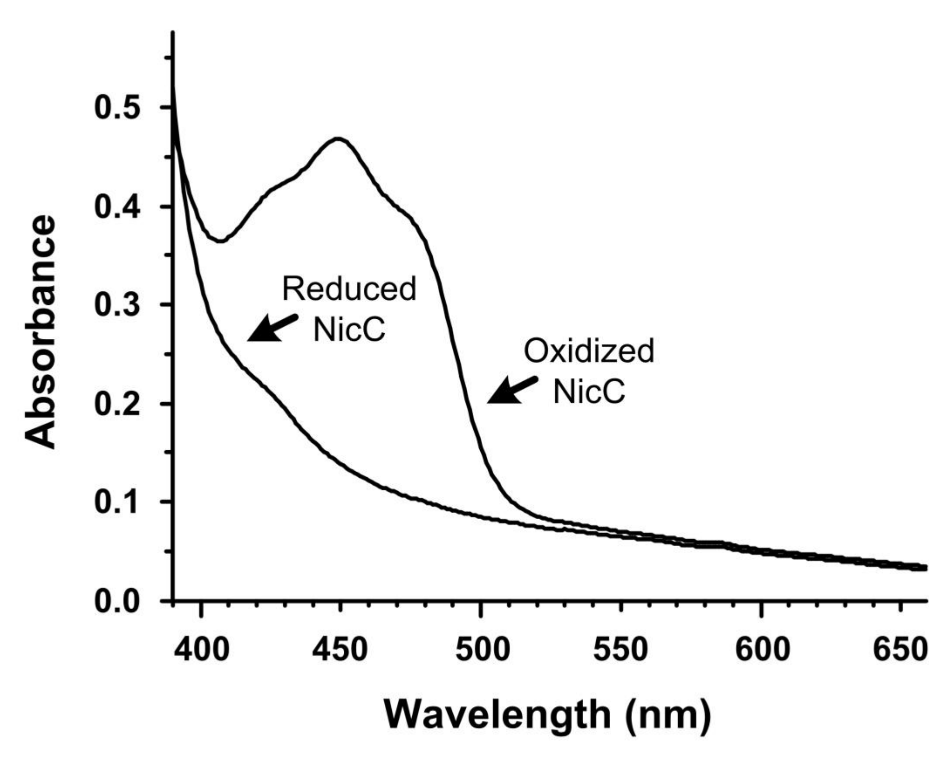


图 4 NADH 还原后的还原态 NicC 的全波长扫描图谱

Fig. 4 Spectrum of NicC reduced by excess NADH

NicC 可以催化 6HNA 生成 2,5-DHP 已经报道，但是该催化反应的另外一个底物并不清楚，推测该催化反应的另外一个底物可能是二氧化碳或者甲酸。为了完全解析 NicC 的催化反应，我们以 NicC 催化反应后的产物作为底物（图 5），检测了反应产物中是否有甲酸的生成。甲酸脱氢酶可以催化甲酸氧化生成二氧化碳，同时将 1 分子的 NAD^+还原为 NADH，通常用于合成生物学中辅酶 NADH 的再生。NADH 在 340 nm 处有吸收峰，因此可以用 340 nm 处吸光值的上升来检测甲酸脱氢酶的活力（图 5 Line 2）。在 NicC 催化 6HNA 反应 300 s 后向反应体系中加入了甲酸脱氢酶。结果表明，不加入甲酸脱氢酶，反应体系吸光值继续缓慢下降（图 5 Line 1、Line 5），而加入甲酸脱氢酶之后 340 nm 处的吸光值开始上升（图 5 Line 3）。只加入甲酸脱氢酶吸光值并没有上升，说明了溶液中的二氧化碳并不能将 NAD^+还原（图 5 Line 4）。该结果表明 NicC 催化反应的另一个产物是甲酸，NicC 能够在 NADH 的参与下，将 6HNA 转化为 2,5-DHP 和甲酸。NicC 还可以利用 NADPH 作为辅酶进行 6HNA 的催化反应，但是活力只有以 NADH 作为辅酶时的 17.8%。

chinaXiv:201904.00094v1

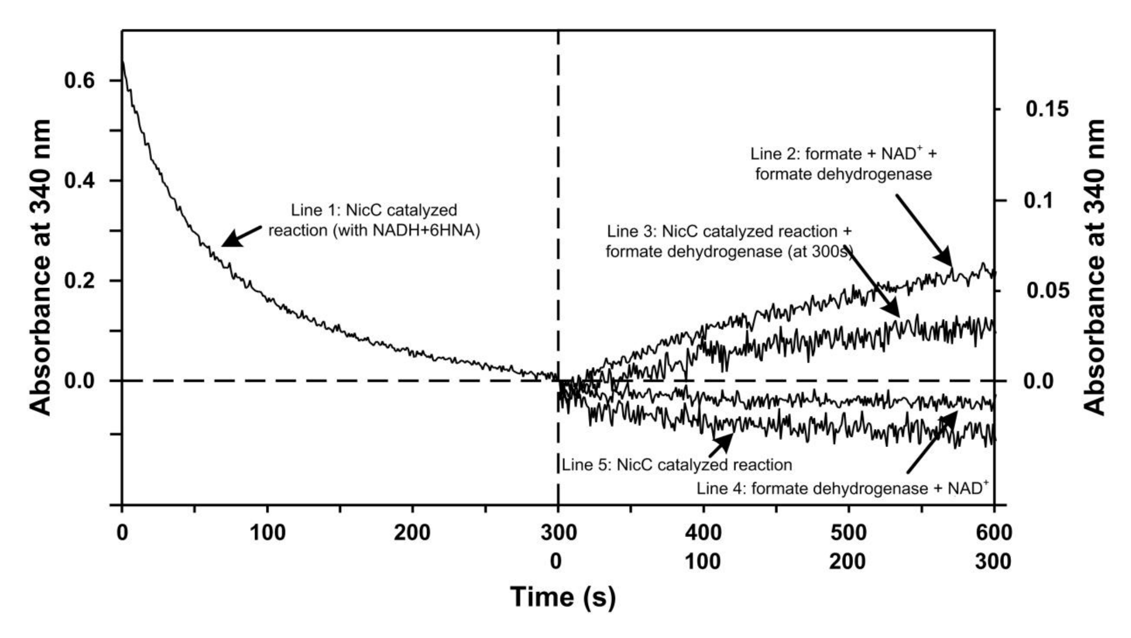


图 5　NicC 催化反应的光谱学分析。左侧曲线：340 nm 下 NicC 催化的氧化反应（NADH 和 6HNA 的初始浓度为 0.25 mM）；右侧曲线 Line 2：甲酸脱氢酶+0.125 mM 甲酸 + 0.125 mM NAD^+；Line 2：在 NicC 催化反应进行到 300 s 时加入甲酸脱氢酶；Line 3：甲酸脱氢酶 + 0.125 mM NAD^+；Line 4：NicC 催化反应不加入任何其他底物。左侧和右侧纵坐标以加入甲酸脱氢酶时的吸光值作为零点。

Fig. 5　Spectrophotometric analysis of NicC catalyzed reaction. Left curve (Line 1) showed the NicC catalyzed reaction with 0.25 mM 6HNA and NADH; Line 2: reaction mixture of 0.125 mM formic acid + 0.125 mM NAD^+ + formate dehydrogenase; Line 3: formate dehydrogenase was added into NicC catalyzed reaction at 300 s; Line 4: formate dehydrogenase + 0.125 mM NAD^+, Line 5: NicC catalyzed reaction without adding any substrates.

2.4　NicC 酶学性质与动力学研究

酶的酶学性质和动力学参数对于该酶在生物技术方面的应用至关重要，因此本研究对纯化出的 NicC 蛋白的相关性质进行了研究。由图 6 可以知道，NicC 的最适温度为 30-40℃，当温度高于 50℃的时候酶活力大幅下降。NicC 在 35℃以下可以保持较好的稳定性，40℃处理 2 h 后酶活只有 25%。NicC 催化反应的最适 pH 为 8.0。与 HspB 不同，Cu^{2+}离子和 Zn^{2+}离子并没有明显抑制 NicC 的酶活，在 2 mM 的 Cd^{2+}离子中 NicC 的酶活只有对照的 16.7%。另外 NicC 在高浓度的 NaCl（200 mM）中，酶活只有对照的 21.1%。当 NADH 的浓度为 0.25 mM 的时候，底物 6HNA 的最大酶活为 14.1 U/mg，K_m 值为 51.8 μM；当 6HNA 的浓度为 0.25 mM 的时候，底物 NADH 的最大酶活为 10.79 U/mg，K_m 值为 15.0 μM（图 6）。

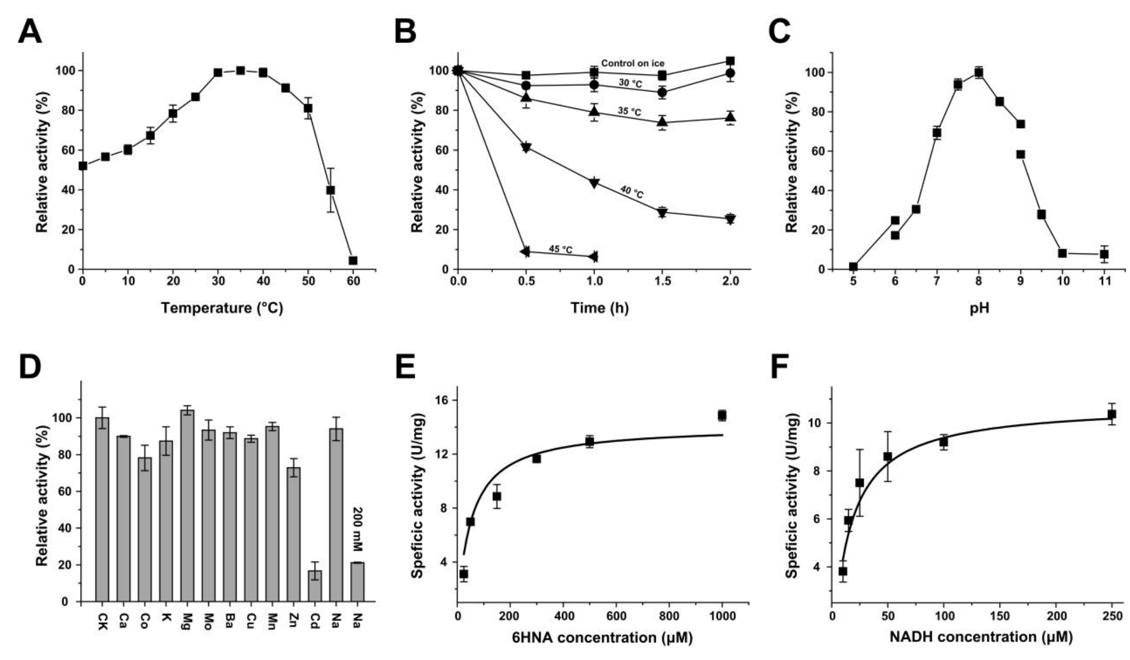


图 6 NicC 酶学性质研究。（A）NicC 最适温度研究；（B）NicC 温度稳定性研究；（C）NicC 最适 pH 研究；（D）金属离子对于 NicC 的酶活的影响；（E）底物 6HNA 的动力学研究；（F）底物 NADH 的动力学研究。

Fig. 6 Characterization of NicC. (A) Temperature dependent enzyme activity of NicC; (B) Temperature stability of NicC; (C) pH-dependent enzyme activity of NicC; (D) Effects of metal ions on NicC activity; (E) Kinetic studies of NicC for 6HNA; (F) Kinetic studies of NicC for NADH.

2.5 底物谱分析

NicC 可以催化底物 6HNA 羟基对位的羧基位置的羟基化反应，因此本研究中选取羟基对位为羧基、氨基和硝基的芳香化合物作为 NicC 的底物进行反应。结果表明，PNP 作为底物的时候 400 nm 处的吸光值没有变化，这说明了 PNP 并没有被转化为新的产物。但是 340 nm 处的吸光值下降明显（超过以 6HNA 作为底物时的反应速率），说明 PNP 可以增加 NicC 的 NADH 氧化酶的活力。也就是说 PNP 可以使得 NicC-FAD-OOH 的衰减变快，这一点和 HspB 的特性是一致的。NicC 可以转化对羟基苯甲酸和对氨基苯甲酸，但是对于对氨基苯甲酸的转化效率非常低。利用 HPLC 检测可以发现，NicC 可以将对羟基苯甲酸转化生成对苯二酚（图 7）。NicC 不能催化 NA 生成 3-羟基吡啶。以上结果表明 NicC 可以催化羟基对位吡啶环或者芳香环的羟基化反应。

chinaXiv:201904.00094v1

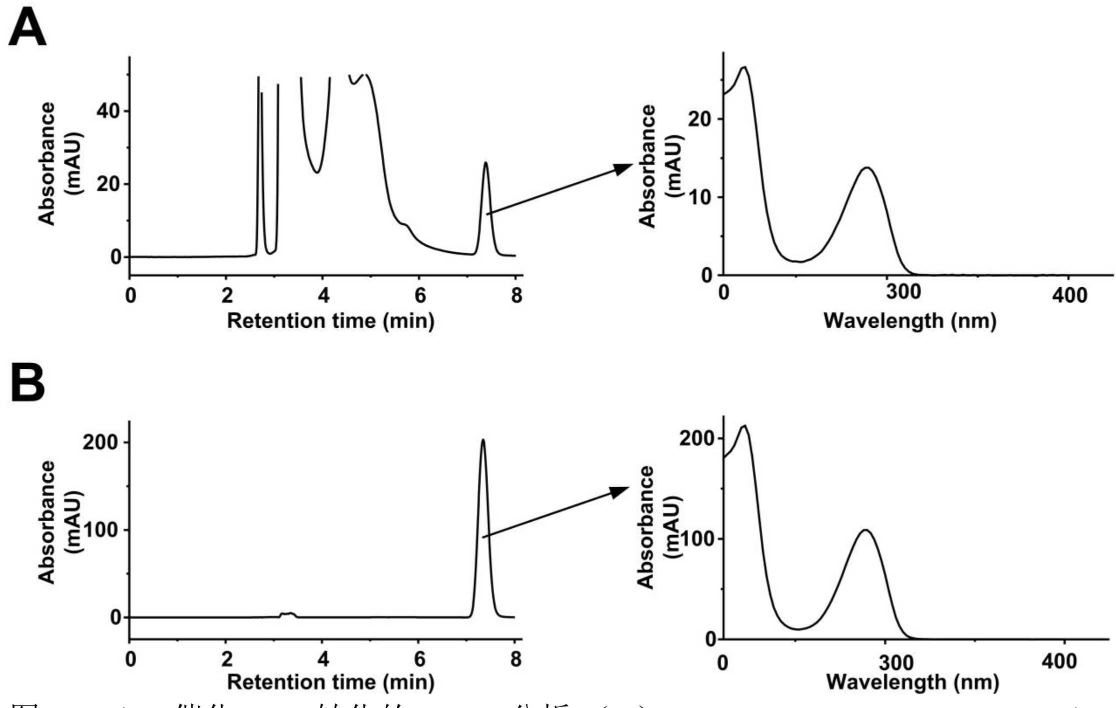


图 7　NicC 催化 PHB 转化的 HPLC 分析。（A）1 mM NADH + 1 mM PHB + NicC 反应 5 min 后进行 HPLC 检测；（B）1 mM 对苯二酚标准品的 HPLC 检测。

Fig. 7　HPLC analysis of NicC catalyzed reaction with PHB. (A) HPLC analysis of NicC catalyzed reaction with 1 mM NADH and 1 mM PHB; (B) The HPLC signal of 1 mM hydroquinone.

chinaXiv:201904.00094v1

2.6　同位素标记实验

前面的实验已经证明，NicC 可以在 NADH 和氧气的参与下催化 6HNA 生成 2,5-DHP 和甲酸。与底物相比较，产物多了一个氧原子和两个氢原子，正好是一个水分子所含的氢原子和氧原子的比例。为了进一步分析氧气和水在反应中的作用，研究中利用同位素标记的氧气和水进行了酶促反应。

通过 LC-MS 分析表明，正常反应体系产物在 ESI-MS 图谱中显示 *m/z* 值为 112.0396，该信号峰代表了产物 2,5-DHP。当利用 ^{18}O 标记的水作为溶剂反应的时候，产物 2,5-DHP 的分子量没有发生变化，说明 NicC 催化 6-羟基烟酸转化成 2,5-DHP 时氧分子并不是来源于水分子中的氧（图 8）。但是当利用 ^{18}O 标记的氧气进行反应的时候，产物 2,5-DHP 的分子量由 112.0398 变成了 114.0396，这表明了 2,5-DHP 分子中新加入的氧原子为 ^{18}O，这表明了氧气参与反应的其中一个氧原子进入到了 2,5-DHP 中（图 9）。

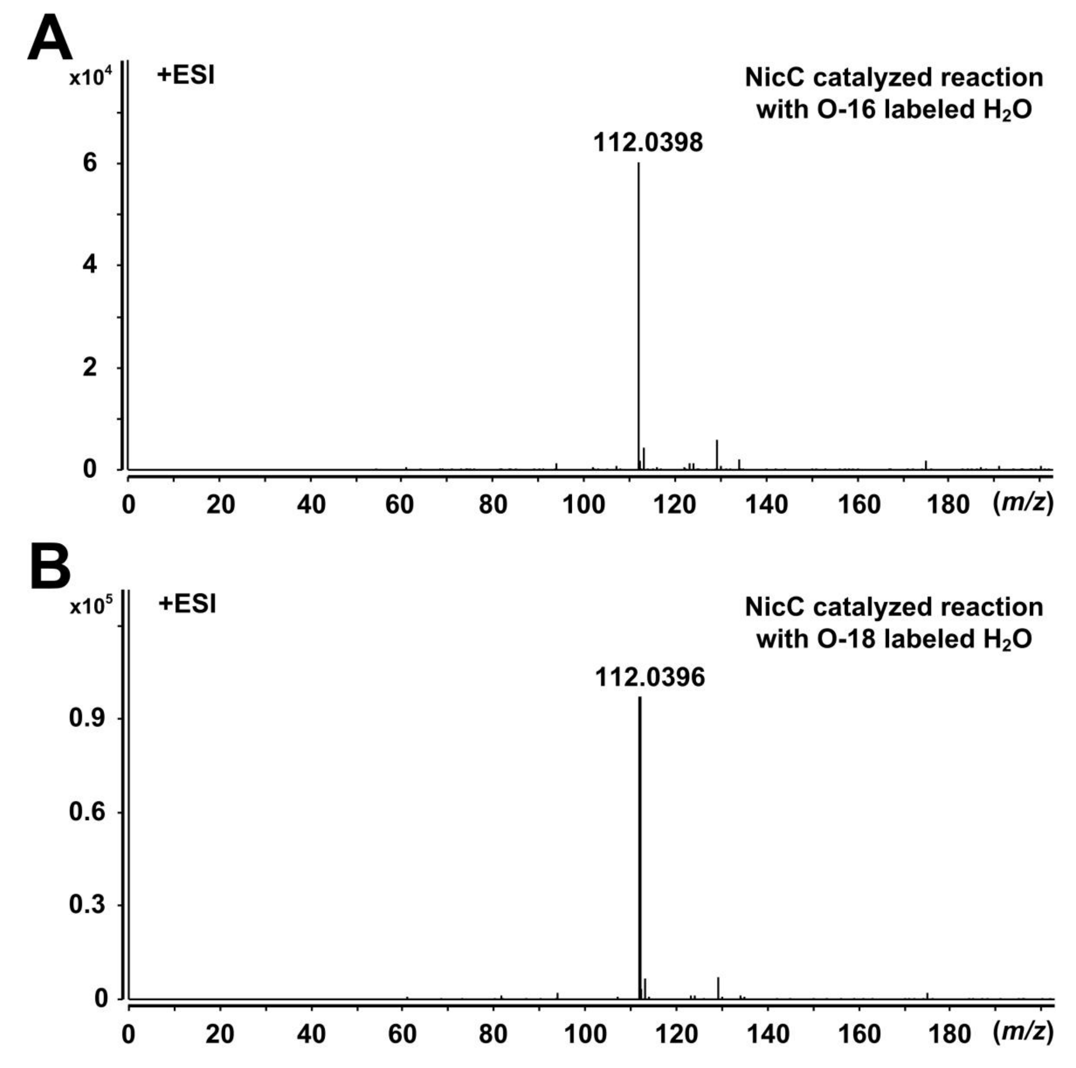
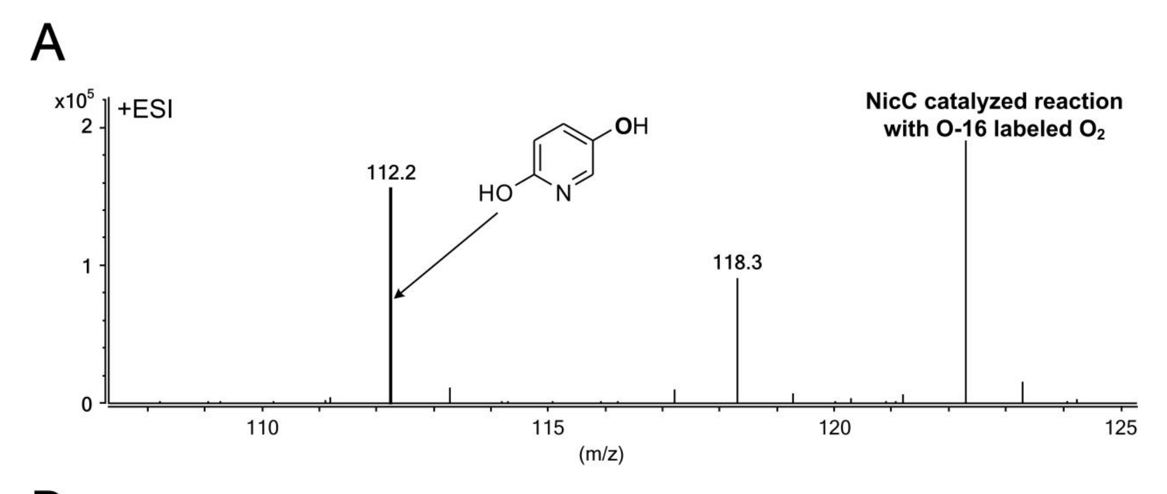


图 8 NicC 催化反应的同位素标记实验。（A）在非同位素标记的水中进行的 NicC 催化反应的底物鉴定；（B）在重氧水中进行的 NicC 催化反应的底物鉴定。

Fig. 8 Isotope labeling experiments of NicC catalyzed reaction. (A) MS analysis of NicC catalyzed reaction in $H_2{}^{16}O$; (B) MS analysis of NicC catalyzed reaction in $H_2{}^{18}O$.

chinaXiv:201904.00094v1

chinaXiv:201904.00094v1



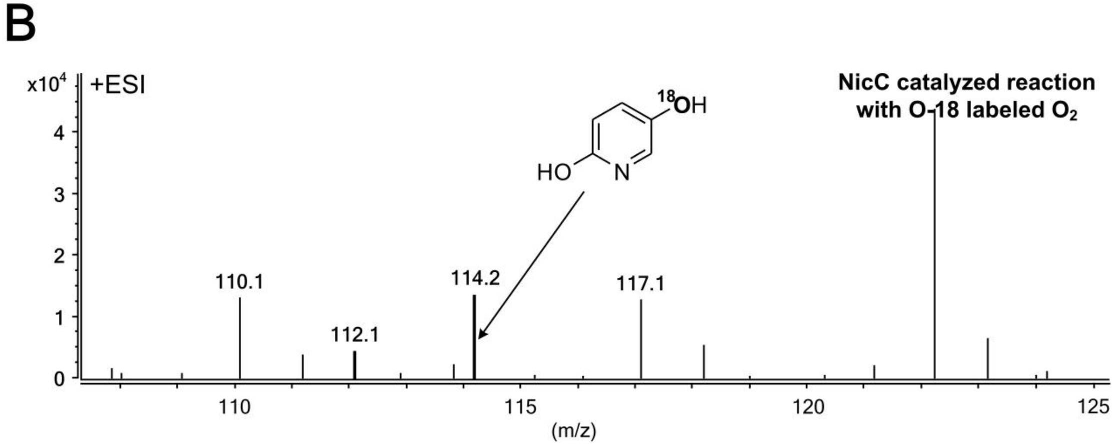


图 9　NicC 催化反应的同位素标记实验。（A）在 $^{16}O_2$ 中进行的 NicC 催化反应；（B）在 $^{18}O_2$ 中进行的 NicC 催化反应。

Fig. 9　Isotope labeling experiments of NicC catalyzed reaction. (A) MS analysis of NicC catalyzed reaction in $^{16}O_2$; (B) MS analysis of NicC catalyzed reaction in $^{18}O_2$.

3　讨论

NicC 属于 FAD 和 NADH 依赖的单加氧酶，该类酶能够在芳香环和吡啶环上面加羟基，从而实现对于芳香环或者吡啶环的活化。含有一个或者两个羟基的芳香族或者吡啶类化合物可以在双加氧酶的作用下开环生成脂肪族化合物，随后通过一系列氧化还原反应被完全分解。因此该类酶在微生物降解芳吡啶类化合物的过程中扮演了重要的角色。如果根据羟基化位点处是否有其他侧链基团存在，该类羟化酶可以分成两类。大部分单加氧酶所催化底物的羟基化位点并没有其他侧链存在，例如催化芳香环羟基化反应的 3-羟基苯甲酸 4-单加氧酶、3-羟基苯甲酸 6-单加氧酶、4-羟基苯甲酸 3-单加氧酶等，以及催化吡啶环羟基化反应的 2,6-二羟基吡啶 3-单加氧酶。还有少量的单加氧酶催化位点有其他的侧链存在，在羟基化反应的同时会发生 C-C 键的断裂。例如催化芳香环羟基化反应的水杨酸 1-单加氧酶、4-氨基苯甲酸 1-单加氧酶、4-羟基苯甲酸 1-单加氧酶等，以及催化吡啶环羟基化反应的 6-羟基-3-琥珀酰吡啶 3-羟化酶（HspB）和本文所研究的 6-羟

基烟酸 3-单加氧酶。上面提及的已报到的同时催化 C-C 键断裂和芳香环羟基化反应的 3 个单加氧酶与 NicC 催化反应类似，都是去掉一个羧基，生成一个羟基，同时会生成一分子 CO_2。另外，HspB 是除 6-羟基烟酸 3-羟化酶之外唯一报道的一个同时催化 C-C 键裂解和吡啶环羟基化的 FAD 依赖单加氧酶。根据我们之前的研究，HspB 会催化 6-羟基 3-琥珀酰吡啶生成 2,5-DHP 和琥珀酸而不是琥珀酸半醛[18]。因此可以推测 NicC 催化的反应有可能会生成 CO_2。根据已报到文献，Hicks 等人也推测 6-羟基烟酸 3-羟化酶催化的反应会生成 CO_2，但是文章并没有对生成的 CO_2 进行检测[16]。在本文中我们通过实验证明了反应过程中会生成甲酸，因此该结果暗示 NicC 与 HspB 可能采取了不同的催化机理。另外，实验表明 Cu^{2+}离子和 Zn^{2+}离子并没有明显抑制 NicC 的酶活，但是 Cu^{2+}和 Zn^{2+}能够明显抑制 HspB 的酶活[18]。通常金属离子对酶活的抑制是由于作用于催化中心的氨基酸导致的，因此可以推测 NicC 和 HspB 催化中心的氨基酸是不同的，着同样暗示 HspB 与 NicC 催化中心的关键氨基酸不同。基于以上结果，推测 NicC 催化反应过程如下：首先 NADH 将 NicC 中的 FAD 还原，生成 FAD-O-OH 中间体，该中间体攻击吡啶环 3-位的碳原子，生成一个含有吡啶环醌式结构的中间化合物，O-O 键断裂氧分子中的一个氧原子以羟基的形式留在吡啶环 3-位碳原子上，生成 3-位碳原子含有 4 个单键的中间化合物，随后通过分子内重排反应侧链脱落生成甲酸，氧原子留在吡啶环上生成了 2,5-DHP。

致谢

该项目受到了国家自然基金青年项目(31600086)、山东省自然基金青年基金(No. ZR2016CQ06)、青岛农业大学人才科研启动基金(No. 6631115052)的资助

chinaXiv:201904.00094v1

参考文献

[1] Xu P, Yu B, Li F L, et al. Microbial degradation of sulfur, nitrogen and oxygen heterocycles. Trends in Microbiology, 2006, 14(9): 398-405.

[2] Gerhild S, Lingens F. Bacterial degradation of *N*-heterocyclic compounds. Biochemistry of Microbial Degradation, 1994, 459-486.

[3] Kaiser J P, Feng Y C, Bollag J M. Microbial metabolism of pyridine, quinoline, acridine, and their derivatives under aerobic and anaerobic conditions. Microbiology Reviews, 1996, 60(3): 483-498.

[4] Yu H, Tang H Z, Zhu X Y, et al. Molecular mechanism of nicotine degradation by a newly isolated strain, *Ochrobactrum* sp. Strain SJY1. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(1): 272-281.

[5] Yoshida T, Nagasawa T. Enzymatic functionalization of aromatic *N*-heterocycles: hydroxylation and carboxylation. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2000, 89(2): 111-118.

[6] Scriven E F V, Toomey J E, Murugan R. Pyridine and pyridine derivatives. In Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, 2005, 20:1-33.

[7] Sims G K, O·Loughlin E J. Degradation of pyridines in the environment. In Critical Reviews in Environmental Control, 1989, 19(4): 309-340.

[8] Sims J, Lee S. Degradation of pyridine derivatives in soil. Journal of Environmental Quality, 1985. 14(4): 580-584.

[9] 胡春辉，徐青，于浩. *Arthrobacter* sp.2PR 降解 2-羟基吡啶动力学及降解特性研究[J]. 中国生物工程杂志, 2017, 37(8): 31-38.

ChinaXiv合作期刊

Hu C H, Xu Q, Yu H. Characteristics and kinetic study of 2-hydroxypyridine degradation by a novel bacteria *Arthrobacter* sp. 2PR. China Biotechnology, 2017, 37(8): 31-38.

[10] Jimenez J I, Canales A, Jimenez-Barbero J, et al. Deciphering the genetic determinants for aerobic nicotinic acid degradation: the nic cluster from *Pseudomonas putida* KT2440. Proc Natl Acad Sci USA, 2008. 105(32): 11329-11334.

[11] Tang H Z, Wang L J, Wang W W, et al. Systematic unraveling of the unsolved pathway of nicotine degradation in *Pseudomonas*. PLOS Genetics, 2013, 9(10): e1003923.

[12] Torimura M, Yoshida H, Kano K, et al. Bioelectrochemical transformation of nicotinic acid into 6-hydroxynicotinic acid on *Pseudomonas fluorescens* TN5-immobilized column electrolytic flow system. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2000, 8(4): 265-273.

[13] Zhang Y T, Chen Q, Ji J B, et al. Complete genome sequence of *Alcaligenes Faecalis* strain JQ135, a bacterium capable of efficiently degrading nicotinic acid. Current Microbiology, 2018, 75(12): 1551-1554.

[14] Nakano N, Fujisawa H. Purification, characterization and gene cloning of 6-hydroxynicotinate 3-monooxygenase from *Pseudomonas fluorescens* TN5. European Journal of Biochemistry, 1999, 260(1): 120-126.

[15] Hurh B, Yamane T, Nagasawa T. Purification and characterization of nicotinic acid dehydrogenase from *Pseudomonas fluorescens* TN5. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1994, 78(1): 19-26.

[16] Hicks K A, Yuen M E, Feng Z W, et al. Structural and biochemical characterization of 6-hydroxynicotinic acid 3-monooxygenase, a novel decarboxylative hydroxylase involved in aerobic nicotinate degradation. Biochemistry, 2016, 55(24): 3432-3446.

[17] Treiber N, Schulz G. Structure of 2,6-dihydroxypyridine 3-hydroxylase from a nicotine-degrading pathway. Journal of Molecular Biology, 2008, 379(1): 94-104.

[18] Yu Hao, Robert P H, Tang H Z, et al. Mechanism of the 6-hydroxy-3-succinoyl-pyridine 3-monooxygenase flavoprotein from *Pseudomonas putida* S16. Journal of Biological Chemistry, 2014, 289(42): 29158-29170.

[19] Gustafsson C, Govindarajan S, Minshull J. Codon bias and heterologous protein expression. Trends in Biotechnology, 2004, 22(7): 346-353.

chinaXiv:201904.00094v1